

广枣提取物大鼠肠外翻的吸收研究

黄壮壮^{1,2}, 李 晔³, 陈衍斌², 龙凯花³, 苏英英², 刘 峰^{1,2,4*} (1. 陕西国际商贸学院, 咸阳 712046; 2. 陕西步长制药有限公司, 西安 710075; 3. 陕西省中医药研究院, 西安 710003; 4. 西安交通大学医学院, 西安 710061)

摘要:目的 研究广枣提取物中 2 种主要代表性成分没食子酸和原儿茶酸在大鼠不同肠段、不同时间的吸收规律。方法 构建大鼠肠外翻模型, 应用 HPLC 法测定广枣提取物肠吸收液中没食子酸和原儿茶酸含量, 计算其吸收参数, 并分析其在大鼠小肠不同部位、不同时间的吸收特征。结果 2.5 h 为肠外翻最终检测时间点, 在建立的分析色谱条件下, 没食子酸和原儿茶酸色谱峰处台氏液和广枣提取物中其他成分对其无干扰, 专属性良好。广枣提取物中原儿茶酸和没食子酸在各肠段均为线性吸收, r^2 值均达到 0.90 以上, 不同肠道部位的累计吸收结果为: 十二指肠 > 空肠 > 回肠 > 结肠。结论 广枣提取物中原儿茶酸和没食子酸在肠道的吸收特征符合零级吸收速率, 其最佳吸收部位为十二指肠。

关键词: 广枣提取物; 原儿茶酸; 没食子酸; 肠外翻; HPLC

DOI: 10.3969/j.issn.1004-2407.2017.05.020

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1004-2407(2017)05-0610-04

Absorption research of the extract of *Fructus Choerospondiatis* in rat everted gut sacs

HUANG Zhuangzhuang^{1,2}, LI Ye³, CHEN Yanbin², LONG Kaihua³, SU Yingying², LIU Feng^{1,2,4*} (1. Shaanxi Institute of International Trade & Commerce, Xianyang 712046, China; 2. Shaanxi Buchang Pharmaceutical Limited company, Xi'an 710075, China; 3. Shaanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710003, China; 4. School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Abstract: Objective To research the intestinal absorption characteristics of representative ingredients including gallic acid (GC) and protocatechuic acid (PA) in *Choerospondiatis Fructus* extracts at different intestinal sections and different time. Methods The everted gut sac model was established, and the contents of GC and PA in the intestinal samples were determined by high performance liquid chromatography (HPLC), with calculating the absorption parameters and analysis of the absorption characteristics in the different parts of rat small intestine at different time. Results The final determination point for everted gut sac was 2.5 h, Tyrode buffer solution and other ingredients had no interference to the chromatographic peak of GC and PA. Both GC and PA were linear absorption in various intestinal segments, and the square of the correlation coefficient (r^2) value was more than 0.90. The advantageous accumulative absorption of different intestinal parts were duodenum, jejunum, ileum and colon. Conclusion Both GC and PA in the intestinal absorption characteristics were accorded with zero order absorption rate, and duodenum was the most absorbed part.

Key words: *Choerospondiatis Fructus* extracts; protocatechuic acid; gallic acid; everted gut sac; HPLC

广枣系蒙古族习用药材, 为漆树科植物南酸枣 (*Choerospondias axillaris* (Roxb.) Burt et Hill) 的干燥成熟果实, 具有养心安神、行气活血之功效, 临床用于治疗心悸气短、心神不安、气滞血瘀、胸痹作痛等症^[1]。药物胃肠道吸收动力学研究是药物代谢动力学研究中的重要组成部分, 口服药物的胃肠道吸收是影响药物生物利用度和变异性的的重要因素, 了解药物的胃肠道吸收特征, 对于药物的剂型、指导临床合理用药具有重要的意义^[2]。目前研究药物在肠内吸收的实验方法主要有整体法、体外法、体内法, 其中体外吸收模型的建立使原本复杂的动物实验相对简单化^[3]。外翻肠囊法俗称肠外翻法, 起初用于研究葡萄糖和氨基酸在肠道的代谢、转运, 1954 年由 Wilson T

H 等^[4]创建, 这种模型已成功应用于药物在肠道的吸收、转运、代谢等方面, 是一种能够快速反映药物吸收行为的体外方法。本研究小组前期建立了广枣提取物中没食子酸和原儿茶酸的质量控制方法, 为本实验研究奠定了一定的基础。因此, 本研究采用外翻肠囊法和 HPLC 法来探讨广枣提取物中代表性成分没食子酸和原儿茶酸在大鼠不同肠段、不同时间的吸收特征。

1 仪器与材料

1.1 仪器 ALC-M 型组织器官水浴系统 (上海奥尔科特生物科技有限公司); 1260 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); RE-52A 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); HC-3018R 高速冷冻离心机 (科大创新股份有限公司中佳分公司); MTN-2800W 型氮吹仪 (AUTO SCIENCE 公司); 优质 UPT-IV-5T 超纯水制备机 (成都超纯科技有限公司); BP211D 电子天平 (德国 Sartorius 公司)。

1.2 试药 没食子酸、原儿茶酸对照品 (没食子酸批号 110831-201204, 原儿茶酸批号 110809-201205, 质

基金项目: 2015 年创新人才推进计划-重点科技创新团队计划项目 (编号: 2015KCT-19); 2016 年陕西省科技统筹创新工程计划项目 (编号: 2016KTTSSF01-04-01)

作者简介: 黄壮壮, 男, 硕士, 药师

* 通信作者: 刘峰, 男, 主任药师, 硕士生导师

量分数均为 98%，购自中国食品药品检定研究院）；甲醇、磷酸（HPLC 级，美国 Fisher 公司）；高纯水（自制）；其余试剂均为分析纯；广枣药材经陕西中医药大学王西芳教授鉴定为漆树科植物南酸枣的干燥成熟果实，购自安徽药材市场；广枣提取物，由陕西步长制药有限公司提取；没食子酸（药材中含 2.12%，提取物中含 10.25%），原儿茶酸（药材中含 3.51%，提取物中含 18.56%）。

1.3 实验动物 SPF 级健康雄性 SD 大鼠，体质量为 180 ± 20 g，由西安交通大学医学部实验动物中心提供，生产许可证号：XJTU-(陕)2011-0045。

2 方法

2.1 试液及样品的制备

2.1.1 台氏缓冲液 分别准确称取氯化钾、磷酸二氢钠、氯化钠、氯化镁和碳酸氢钠 0.28, 0.05, 8.0, 0.10 和 1.0 g，溶于 500 mL 三蒸水中，密闭冷藏；准确称取氯化钙 0.20 g，加 500 mL 三蒸水溶解，密闭冷藏；使用前将二者混匀，随后加入 1.0 g 葡萄糖完全溶解，即得。

2.1.2 对照品溶液 分别精密称取没食子酸和原儿茶酸对照品 8.531 和 5.242 mg，置于同一 10 mL 棕色量瓶中，加甲醇溶解，超声，定容，制成 1 mL 分别含没食子酸和原儿茶酸 0.853 1 和 0.524 2 mg 的溶液，密封冷藏，备用。

2.1.3 广枣药液 准确称取 1.20 g 广枣提取物，加 100 mL 台氏液超声完全溶解，制成质量浓度为 $12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的广枣含药台氏液。

2.2 分析方法的建立 色谱柱：Kromasil Su C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5.0 μm)；流动相：甲醇-4 mL $\cdot$ L $^{-1}$ 磷酸水溶液；流速：1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$ ；检测波长：270 nm；柱温：35 $^{\circ}\text{C}$ ；进样量：10 μL [5]。

2.3 外翻肠囊模型的制作与取样 取 SD 大鼠，禁食 12 h，脱臼处死。沿腹中线剪开皮肤和肌肉组织，找到胃幽门，自胃幽门下分别截取等长的十二指肠、空肠、回肠和结肠段。将截取后的肠管置于含有 0 $^{\circ}\text{C}$ 台氏液的培养皿中冲洗至无小肠内容物，用硅胶导管类似拨袖套方式小心将肠道内表面翻转至外表面，用 0 $^{\circ}\text{C}$ 台氏缓冲液冲洗内表面至干净，将针头一端插入肠管中并用丝线结扎，另一端用丝线结扎成囊状，保证结扎肠管长度一致和无破损。将肠管固定在盛有 25 mL、37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温浴槽中，通入 95% O_2 和 5% CO_2 的混合气体，在肠管中注入 2.0 mL 台氏液平衡 5 min，将质量浓度为 $12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的广枣提取物含药台氏液加入浴槽，在 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 和 3.5 h 后分别从肠管内液取样 300 μL ，同时补充等体积的 37

$^{\circ}\text{C}$ 空白台氏液。样品放入干净的 EP 管中，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存，待用 [6-7]。

2.4 样品的处理 吸取 250 μL 样品，使用氮吹仪吹干，加 500 μL 甲醇超声 30 min，以 3 000 r $\cdot$ min $^{-1}$ 离心 5 min，取上清液，氮气吹干，加 250 μL 体积分数为 70% 的甲醇复溶，用 0.22 μm 滤器滤过。

2.5 肠活性评价实验 肠细胞受损时，会迅速释放大量的乳酸脱氢酶(LDH)，采用酶标法于 450 nm 处测定吸光度值来检测单位面积内小肠释放 LDH 的活力，从而对小肠活性进行评价。分别对 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 和 3.5 h 的肠吸收液样品进行 LDH 检测。

2.6 专属性实验 比较空白台氏液、没食子酸和原儿茶酸混合对照品、广枣提取物肠吸收液色谱行为，确定在原儿茶酸和没食子酸色谱峰处杂质不干扰测定。

2.7 药物累计吸收量的计算 药物累计吸收量按照 $Q = C_n V_0 + V_1 \sum_{i=1}^{n-1} C_i$ 计算， Q 为药物各时间点的累计吸收量， V_0 为加入肠囊空白台氏液的体积 (mL)， V_1 为每次取样的肠吸收液体积 (mL)， C_n 为各时间点取样的实际检测质量浓度， C_i 为样品质量浓度。

2.8 统计学处理 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 17.0 统计软件。组间数据比较采用单因素方差分析，组内数据比较采用 t 检验， $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义，显著性水平 $\alpha = 0.05$ 。

3 实验结果

3.1 肠细胞活性评价 与 0 h 时 LDH 的活性值比较，0.5, 1.0, 1.5, 2.0 和 2.5 h 的活性值差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)，随着时间的延长，3.0 和 3.5 h 的活性值与初始值比较差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)，表明肠活性已经遭到严重破坏，因此本实验确定 2.5 h 为肠外翻最终检测时间点。见图 1。

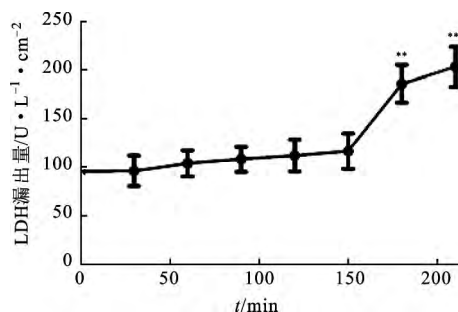


图 1 不同时间点单位面积肠组织释放 LDH 的漏出量 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

注：与 0 h 时刻 LDH 值比较 ** $P < 0.01$ 。

Fig. 1 LDH release value per unit area in different time points in the intestinal tissue ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Note: compared with the value of 0 h LDH ** $P < 0.01$.

3.2 专属性实验 在建立的 HPLC 色谱条件下，没食子酸和原儿茶酸色谱峰处台氏液和广枣提取物中

其他成分对其无干扰,且二者峰形较好,说明方法专属性良好。见图 2。

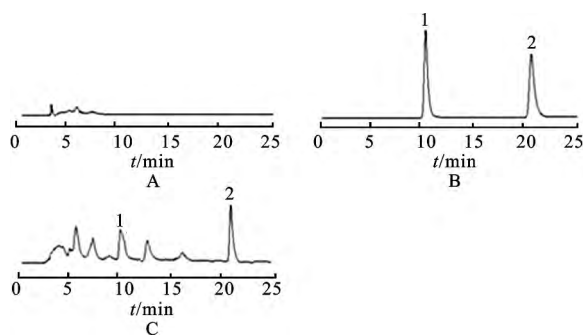


图 2 广枣提取物专属性 HPLC 图

A. 空白台氏液;B. 没食子酸和原儿茶酸混合对照品;C. 广枣提取物肠吸收液;1. 没食子酸;2. 原儿茶酸

Fig. 2 HPLC of the *Choerospondiatis Fructus* extracts in the specific experiment

A. blank sample;B. mixed control substances of GC and PA;C. intestinal absorption liquid of the *Choerospondiatis Fructus* extracts;1. gallic acid;2. protocatechuic acid

3.3 广枣提取物中原儿茶酸和没食子酸的吸收情况

广枣中的没食子酸和原儿茶酸均能透过大鼠小肠吸收,以原儿茶酸和没食子酸不同时刻的累计吸收质量浓度对时间作相关回归分析,二者在各肠段的吸收均为线性吸收,其 r^2 值均达到 0.90 以上。见图 3。

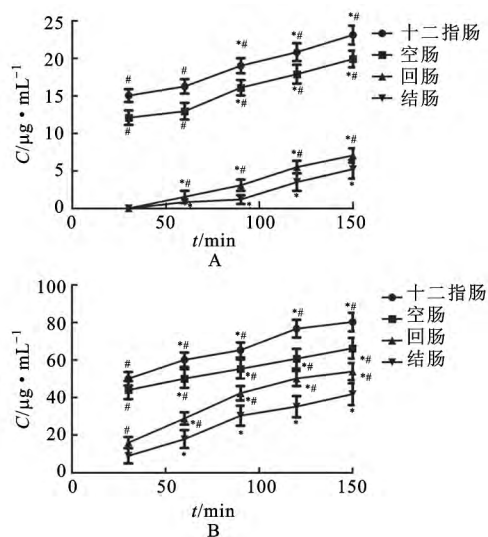


图 3 没食子酸和原儿茶酸在不同时刻不同肠段时间-累计吸收曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

A. 没食子酸;B. 原儿茶酸

注:同一肠段各时刻累计吸收质量浓度与 0.5 h 时刻累计吸收质量浓度比较 * $P < 0.05$;同一时刻不同肠段累计吸收质量浓度与结肠段累计吸收质量浓度比较 # $P < 0.05$ 。

Fig. 3 Time-total absorption curve of GC and PA at different time and different intestines ($\bar{x} \pm s, n=6$)

A. gallic acid;B. protocatechuic acid

Note:based on the same intestinal segment,compared with the accumulative absorption concentration of 0.5 h value * $P < 0.05$;based on the same moment,compared with the accumulative absorption concentration of colon # $P < 0.05$.

3.4 小肠不同部位没食子酸和原儿茶酸累计吸收量的比较 没食子酸在 0.5 h 回肠和结肠段没有吸收,但十二指肠和空肠段有明显吸收,原儿茶酸在 0.5 h 时各肠段均有吸收,随着时间的延长,没食子酸和原儿茶酸累积吸收量也不断增加,2.5 h 时吸收值达到最大,同一时刻二者在各肠段的吸收趋势依次为:十二指肠 > 空肠 > 回肠 > 结肠。见图 4。

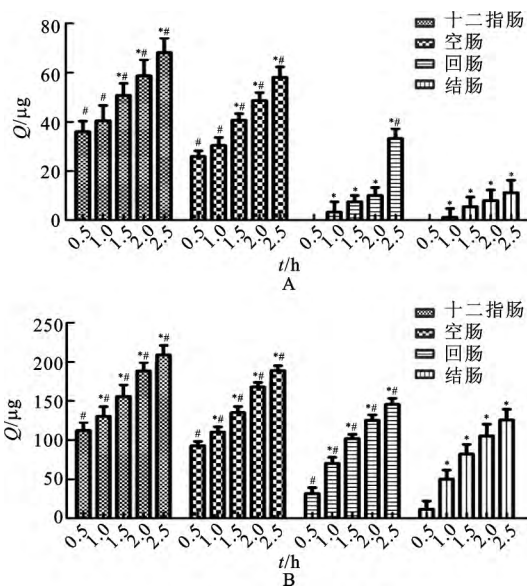


图 4 没食子酸和原儿茶酸在不同时刻不同肠段累计吸收量 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

A. 没食子酸;B. 原儿茶酸

注:同一肠段各时刻累计吸收量与 0.5 h 时刻累计吸收量比较 * $P < 0.05$;同一时刻不同肠段累计吸收量与结肠段累计吸收量比较 # $P < 0.05$ 。

Fig. 4 The total absorption of GC and PA at different times and different intestines ($\bar{x} \pm s, n=6$)

A. gallic acid;B. protocatechuic acid

Note:based on the same intestinal segment,compared with the accumulative absorption amount of 0.5 h value * $P < 0.05$;based on the same moment,compared with the accumulative absorption amount of colon # $P < 0.05$.

4 讨论

为了确保实验数据与体内吸收有良好的相关性,在含药台氏液样品的制备过程中,以有效剂量为折算依据,来确定台氏液中的药物质量浓度,换算公式为:药液质量浓度 = 大鼠给药量 / 浴管中供试液体积^[6]。实验以 LDH 为考察指标对肠囊的活性进行考察,时间较短会导致透过小肠的组分较少,时间过长会诱发离体的小肠腐坏,不能真实反映组分的透过吸收^[8]。实验结果表明,培养时间 2.5 h 较为适宜。0 h 时 LDH 的活性为 $95.28 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$,这可能与造模时肠管的分段切割以及外翻操作本身有关。

广枣中主要成分包括黄酮类、酚酸类、有机酸类、

挥发油类、香豆素类、多糖类和氨基酸等^[9],本实验在课题小组前期关于广枣质量标准提高研究工作的基础上,选择没食子酸和原儿茶酸作为广枣代表性成分,在前期已经建立好的液相条件和检测波长下,这 2 种成分在肠吸收液中也均能检测到,说明二者是以原型的形式在小肠吸收的。专属性实验表明,没食子酸和原儿茶酸能够完全分离,小肠内容物对广枣肠吸收中二者检测分离没有造成干扰,进一步验证了分析条件稳定、可靠。

没食子酸化学名为 3,4,5-三羟基苯甲酸,是一种多酚类化合物,具有抗炎、抗突变、抗氧化等多种生物学活性^[10],原儿茶酸对大鼠心肌缺血/再灌注损伤具有一定的保护作用,表明没食子酸和原儿茶酸为广枣有效成分,但几乎无相关文献报道其在药物动力学实验方面的研究。研究结果表明,没食子酸和原儿茶酸在大鼠各肠段均为线性吸收, r^2 值均达到 0.90 以上,符合零级吸收速率相关特征。2 个成分在相同肠段的吸收差异较大,且同一个成分在相同部位不同质量浓度的吸收也存在差异,验证了小肠对中药成分具有选择性吸收,而不是简单的半透膜被动吸收过程^[11]。肠道不同部位的吸收实验结果表明,十二指肠>空肠>回肠>结肠,这与之之前的文献报道结果一致^[12-15]。越来越多的证据表明,药物转运体在中药的肠吸收机制中扮演着重要的角色,如 P-糖蛋白(P-gp),多药耐药相关蛋白(MRP)等^[16],这也进一步说明药物吸收除了如自身的化学结构及生物利用度等因素外,同时还受到转运载体的影响。药物成分必须通过肠黏膜上皮细胞才能进入血液,物质通过这些膜的吸收机制主要包括自由扩散、易化扩散、主动运输、外排分泌及胞内代谢等方式^[17-18],广枣提取物中 2 个有效成分没食子酸和原儿茶酸在大鼠各肠段均为线性吸收, r^2 值均达到 0.90 以上,符合零级吸收速率相关特征,说明其可能的吸收机制为被动吸收。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典:2010 年版:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:41.
- [2] 董宇,张英风,杨庆,等. 黄连提取物在大鼠肠外翻实验中的吸收研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(9):1056-1060.
- [3] 陈晓萌,陈畅,李德凤,等. 中药有效成分辨识的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(12):249-252.
- [4] Wilson T H, Wiseman G. The use of sacs of everted

small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface[J]. J Physiol, 1954,123(1):116-125.

- [5] 桑柏. “广枣-檀香”君-使对药的效应物质研究[D]. 西安:西北大学,2010:17-18.
- [6] 朱晶晶,王智民,龚幕辛,等. 基于肠吸收的质量评价指标选择的方法和原则[J]. 中国中药杂志,2011,36(6):659-662.
- [7] 王嫦鹤,刘雪峰,王莉,等. 外翻肠囊法研究奥硝唑对映体在大鼠不同肠段的吸收特性[J]. 西北药学杂志,2016,31(4):371-374.
- [8] Ming Li, Luqin Si, Hongping Pan, et al. Excipients enhance intestinal absorption of ganciclovir by P-gp inhibition: Assessed *in vitro* by everted gut sac and *in situ* by improved intestinal perfusion[J]. Int J Pharmaceut, 2011,403(1):37-45.
- [9] 唐丽,李国玉,杨柄友,等. 广枣化学成分的研究[J]. 中草药,2009,40(4):541-543.
- [10] 卜丽梅,关凤英,乔萍,等. 没食子酸对大鼠缺血再灌注损伤后细胞凋亡的保护作用及机制研究[J]. 中国实验诊断学,2010,14(11):1693-1696.
- [11] 唐丽,刘跃,黄勇,等. 离体外翻肠囊法研究头花蓼提取物中 5 个成分的肠吸收特性[J]. 中国药理学通报,2014,30(7):1031-1032.
- [12] 董宇,张英风,杨庆,等. 炒白芍提取物在大鼠肠外翻囊实验中的吸收及与 P-gp 相互作用研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(7):884-888.
- [13] 刘跃,唐丽,曹旭,等. 茜草提取物的肠外翻吸收研究[J]. 中国中药杂志,2014,39(11):2121-2125.
- [14] 王小潘,吕慧侠, Ayman Y Wadad, 等. 荭草酸大鼠在体肠吸收动力学的研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(14):2079-2082.
- [15] 李喜平,张程亮,刘东,等. 外翻肠囊法考察环孢素在大鼠各肠段的吸收特性[J]. 医药导报,2013,32(10):1293-1295.
- [16] 吴涛,郑娟,徐艳娇,等. 中药肠吸收的研究进展[J]. 药物与临床,2013,10(6):30-35.
- [17] Chan L M S, Lowes S, Hirst B H. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability[J]. Eur J Pharm Sci, 2004,21(1):25-51.
- [18] 高坤,孙进,何仲贵,等. 口服药物吸收中的生物药剂学性质[J]. 沈阳药科大学学报,2007,24(3):186-192.

(收稿日期:2016-11-18)